

# Promoção de crescimento e indução de resistência à antracnose por *Trichoderma* spp. em pepineiro

Veronica Nogueira da Silva<sup>(1)</sup>, Sylvia Dias Guzzo<sup>(1)</sup>, Cleusa Maria Mantovanello Lucon<sup>(1)</sup> e Ricardo Harakava<sup>(1)</sup>

<sup>(1)</sup>Instituto Biológico, Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Vegetal, Laboratório de Bioquímica Fitopatológica, Avenida Conselheiro Rodrigues Alves, nº 1.252, Caixa Postal 12.898, CEP 04010-970 São Paulo, SP. E-mail: [veronicans@gmail.com](mailto:veronicans@gmail.com), [guzzo@biologico.sp.gov.br](mailto:guzzo@biologico.sp.gov.br), [mantova@biologico.sp.gov.br](mailto:mantova@biologico.sp.gov.br), [harakava@biologico.sp.gov.br](mailto:harakava@biologico.sp.gov.br)

**Resumo** – O objetivo deste trabalho foi determinar o efeito de 60 isolados de *Trichoderma* e do produto Trichodermil na promoção do crescimento e na indução de resistência sistêmica à antracnose, causada por *Colletotrichum lagenarium* em pepineiro, além de identificar as espécies dos isolados de *Trichoderma* spp. efetivas como indutores de resistência. Nos experimentos de promoção de crescimento, os isolados de *Trichoderma* spp. foram submetidos à inoculação no substrato e, após 21 dias, a massa de matéria seca da parte aérea das plantas foi mensurada. Nos experimentos de indução de resistência, os isolados que promoveram crescimento foram introduzidos no substrato, na base das plantas, sete dias antes da inoculação de *C. lagenarium* nas folhas. O isolado que apresentou melhor desempenho foi avaliado quanto à redução dos sintomas de antracnose, em aplicações aos 3, 7 ou 14 dias antes da inoculação do patógeno, e quanto à capacidade de aumentar a atividade de peroxidase. Dezenove isolados e o Trichodermil promoveram o crescimento de pepineiro em até 100% e conferiram proteção à antracnose em até 88,39%. O isolado IB 31/06 reduziu a severidade da doença nos intervalos de tempo avaliados. Não foi observado aumento significativo de peroxidase, sete dias após o tratamento com IB 31/06, nas plantas tratadas e infectadas com o patógeno, em comparação às plantas infectadas. O sequenciamento gênico dos dezenove isolados permitiu a identificação de sete espécies distintas de *Trichoderma*.

**Termos para indexação:** *Colletotrichum lagenarium*, *Cucumis sativus*, antagonismo, biocontrole, indução de proteção sistêmica, peroxidase.

## Growth promotion and resistance induction against anthracnose in cucumber using *Trichoderma* spp.

**Abstract** – The objective of this work was to determine the effect of 60 isolates of *Trichoderma* and the product Trichodermil on the growth promotion and on the induction of systemic resistance to anthracnose caused by *Colletotrichum lagenarium* in cucumber, and to identify isolates of *Trichoderma* spp. effective as resistance inductors. In the assays of growth promotion, the *Trichoderma* spp. isolates were inoculated in the substrate and, after 21 days, the shoot dry weight of the plants was measured. In the experiments of resistance induction, the isolates which promoted growth were inoculated in the substrate, at the base of the plants, seven days before *C. lagenarium* inoculation in the leaves. The isolate which showed the best performance was evaluated for anthracnose symptom reduction in applications at 3, 7 or 14 days before the pathogen inoculation, and for its ability of increasing the peroxidase activity. Nineteen isolates and Trichodermil promoted cucumber growth up to 100% and conferred plant protection against anthracnose up to 88.39%. The isolate IB 31/06 reduced the disease severity at the evaluated time intervals. No significant peroxidase increase was observed seven days after treatment with IB 31/06, in the plants treated and infected with the pathogen, in comparison to infected plants. Gene sequencing of the 19 isolates allowed for the identification of seven *Trichoderma* different species.

**Index terms:** *Colletotrichum lagenarium*, *Cucumis sativus*, antagonism, biocontrol, induced systemic protection, peroxidase.

## Introdução

O fungo *Colletotrichum lagenarium* (Pass.) Ellis & Halsted, agente causal da antracnose em cucurbitáceas, apresenta como sinônimas *Colletotrichum orbiculare*

(Berk. & Mont.) Arx. e *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *cucurbitae* (Berk. & Mont.). A doença é importante pela frequência com que ocorre e pelos danos que causa à cultura do pepino e em outras cucurbitáceas (Agrios, 2004; Rios et al., 2004).

Os prejuízos causados pelo uso frequente de produtos químicos, para controlar doenças de plantas, motivam a busca de métodos alternativos de controle. Agentes de controle biológico como *Trichoderma* spp. e indutores de resistência bióticos e abióticos são alternativas ao uso de pesticidas (Perazzolli et al., 2008).

O potencial de *Trichoderma* spp., como agentes de biocontrole, é conhecido há mais de 60 anos, e muitos isolados são simbioses de plantas e podem atuar no controle de fitopatógenos (Brotman et al., 2010). As espécies do gênero *Trichoderma* estão entre os antagonistas mais estudados, pois são encontradas naturalmente em quase todos os tipos de solo e agem contra fitopatógenos por diferentes mecanismos de ação como antibiose, micoparasitismo, produção de enzimas degradadoras de parede celular, competição por nutrientes e substrato, promoção do crescimento das plantas e indutores de resistência contra diversos patógenos, com efeitos benéficos para as plantas (Harman et al., 2004; Shores et al., 2005; Viterbo et al., 2005; Perazzolli et al., 2008; Vinale et al., 2008).

Em pepineiro (*Cucumis sativus* L.), Yedidia et al. (2003) verificaram que o isolado T-203 de *Trichoderma asperellum*, inoculado no sistema radicular, conferiu proteção sistêmica à mancha-angular causada por *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* e reduziu em 80% os sintomas da doença. A proteção propiciada pelo agente de biocontrole foi associada ao acúmulo de mRNAs codificadores das enzimas de defesa fenilalanina amônia-liase e hidroperóxido liase. Raízes de pepineiro, tratadas com um isolado de *T. harzianum*, exibiram aumentos das atividades das enzimas quitinase,  $\beta$ -1,3-glucanase, celulase e peroxidase, observados até 72 horas após o tratamento (Yedidia et al., 2000).

Entretanto, a indução de resistência em plantas por espécies de *Trichoderma* tem sido pouco estudada, em comparação às pesquisas similares realizadas com rizobactérias promotoras de crescimento (Harman et al., 2004). No Brasil, os estudos relacionados à utilização de *Trichoderma* spp., no controle de doenças de plantas, têm focalizado efeitos diretos sobre fitopatógenos e não têm sido direcionados para o mecanismo indireto de ação que envolve a indução de resistência.

O objetivo deste trabalho foi determinar o efeito de 60 isolados de *Trichoderma* e do produto comercial Trichodermil na promoção do crescimento e na indução de resistência sistêmica à antracnose, causada por *C. lagenarium* em pepineiro, além de identificar

as espécies dos isolados de *Trichoderma* spp. efetivas como indutores de resistência.

## Material e Métodos

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Bioquímica Fitopatológica do Instituto Biológico, São Paulo, SP, de janeiro de 2009 a fevereiro de 2011. Foram utilizadas sementes de pepino híbrido 'Safira' (Sakata Seed Sudamerica Ltda., Bragança Paulista, SP), cultivadas em substratos comerciais Plantmax Hortaliças HT, (Eucatex Agro, Botucatu, SP) e Tropstrato Hortaliça 1, (VidaVerde, Mogi Mirim, SP) e mantidas em casa de vegetação, onde foram irrigadas por microaspersão automática duas vezes ao dia.

Para avaliar a capacidade de 60 isolados monospóricos de *Trichoderma* spp., da Coleção de Culturas do Laboratório de Bioquímica Fitopatológica, do Instituto Biológico, São Paulo, SP, na promoção de crescimento de plantas de pepino, foram preparados inicialmente os inóculos de *Trichoderma* spp. Para isto, dois discos de 9 mm de diâmetro de meio de cultura batata-dextrose-água (BDA), com as estruturas propagativas dos isolados, foram transferidos assepticamente para sacos de plástico que continham 30 g de arroz e 30 mL de água destilada previamente esterilizados. A seguir, foram incubados em câmara BOD a 25°C, com fotoperíodo de 12 horas, por uma semana. Após esse período, os isolados de *Trichoderma* spp. foram introduzidos, separadamente, no substrato comercial Plantmax Hortaliças HT, pela adição de arroz colonizado a 2% (peso:volume). O substrato Plantmax HT foi infestado, separadamente, por meio da adição de 30 g de arroz colonizado pelos isolados de *Trichoderma* spp. (em média  $2,4 \times 10^9$  UFC g<sup>-1</sup>) a 1.500 mL de substrato e 30 mL de água destilada. No tratamento controle, apenas arroz comercial esterilizado foi adicionado ao substrato. A mistura foi incubada por uma semana à temperatura ambiente e, em seguida, as sementes foram semeadas no substrato infestado.

O produto Trichodermil SC (Itaforte BioProdutos, Itapetininga, SP), formulado com *Trichoderma harzianum* (IT 13/06), concentração mínima de  $2 \times 10^{12}$  L<sup>-1</sup> de conídios viáveis, foi aplicado ao substrato conforme indicações do fabricante. Alíquotas de um mililitro de suspensão aquosa do produto à concentração de 0,1% (v/v) foram adicionadas a cada 250 mL de substrato.

As mudas foram mantidas em casa de vegetação até 21 dias de idade, quando a parte aérea das plantas foi seca em estufa a 65–70°C até obtenção de massa constante.

Os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado, com 25 repetições, e cada repetição foi constituída de uma planta; avaliou-se a massa de matéria seca da parte aérea das plantas de pepino (MMS). A massa do sistema radicular não foi avaliada, em razão do grande número de isolados de *Trichoderma* spp., testados nos experimentos de promoção de crescimento de pepino. Optou-se pela medida da parte aérea, que reflete o bom desenvolvimento do sistema radicular (Björkman et al., 1998).

Os 60 isolados foram divididos aleatoriamente em dois grupos de 30 e avaliados em dois experimentos por período, repetidos três vezes, no total de seis experimentos, com cinco repetições de cinco plantas cada. Os primeiros dois experimentos foram realizados em janeiro e fevereiro de 2009, para cada grupo de 30 isolados. O segundo grupo de dois experimentos foi conduzido em julho e agosto de 2009, e o terceiro em novembro e dezembro de 2009. Nos experimentos, as plantas foram irrigadas por microaspersão automática, duas vezes ao dia, por 5 a 7 min, durante o inverno e verão, respectivamente, e mantidas em casa de vegetação à temperatura mínima média de 14,4°C e máxima de 30,8°C, de acordo com a época do ano em que os experimentos foram realizados. O efeito do *Trichoderma* na promoção de crescimento foi avaliado no experimento realizado em dezembro de 2009.

Para o experimento de indução de resistência sistêmica à antracnose em pepineiro, foram utilizados 19 isolados de *Trichoderma* spp., que aumentaram significativamente a MMS em pelo menos um dos experimentos de promoção de crescimento realizados. Os grãos de arroz colonizados por *Trichoderma* spp., preparados conforme metodologia já descrita, foram introduzidos no substrato de crescimento Tropstrato Hortaliça 1 a 2% (peso:volume), com plantas de pepino com 14 dias de idade. A concentração de *Trichoderma* spp. utilizada no experimento foi determinada pela quantificação do número de conídios, por meio de diluição seriada de amostras de 1 g de arroz colonizado, com cada um dos isolados, em 9 mL de solução salina a 0,9%, e contagem subsequente dos conídios em microscópio ótico. Foram utilizadas nos experimentos concentrações de 9 a  $71 \times 10^8$  de conídios por grama de arroz colonizado. Como controle, foi inserido no substrato o arroz comercial sem *Trichoderma* spp.

Após sete dias, as primeiras e segundas folhas verdadeiras das plantas foram infectadas por aspersão, até o ponto de escorrimento, com 5 mL de suspensão de esporos de *C. lagenarium*, por planta, à concentração de  $1 \times 10^5$  mL<sup>-1</sup>

de conídios. A suspensão foi preparada a partir da cultura do patógeno em meio aveia, mantida por cinco dias a 25°C e em fotoperíodo de 12 horas. As plantas infectadas foram mantidas por 72 horas em câmara de crescimento a  $\pm 24^\circ\text{C}$ , com umidade relativa (UR) superior a 90%, em fotoperíodo de 12 horas e, em seguida, permaneceram na mesma câmara, sem umidificação adicional até o aparecimento dos sintomas. Empregou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado, tendo-se utilizado dez plantas por tratamento. A severidade da antracnose foi avaliada nove dias após a inoculação do patógeno, pela contagem do número de lesões por folha em cada planta, de acordo com Kuć & Richmond (1977). A proteção foi quantificada como redução da severidade da doença e expressa como percentagem do controle.

A concentração e a viabilidade de conídios de *Trichoderma* spp. e do *Trichoderma*, utilizados no experimento de indução de resistência, foram determinadas ao microscópio ótico (250x), com auxílio da câmara de Neubauer. Foram avaliados 100 conídios por repetição (quatro repetições por tratamento), entre germinados e não germinados, presentes na suspensão 12 horas após o plaqueamento em meio BDA.

Para avaliar o efeito do intervalo de tempo entre a infestação com *Trichoderma* sp. e a inoculação de *C. lagenarium* nas plantas, na redução da severidade de doença, utilizou-se o isolado IB 31/06. Plantas de pepino com 14 dias de idade foram tratadas com esse isolado de *Trichoderma*, introduzido diretamente no substrato de crescimento, conforme metodologia anterior, aos 3, 7 ou 14 dias antes da inoculação. A inoculação de *C. lagenarium* ( $1 \times 10^5$  mL<sup>-1</sup> de conídios) foi feita por meio da aspersão de 5 mL de suspensão sobre as folhas verdadeiras de pepineiro, por planta. Utilizou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado, com dez plantas por tratamento. A severidade da antracnose foi avaliada nove dias após a inoculação do patógeno, conforme Kuć & Richmond (1977).

Para a quantificação da atividade da peroxidase por miligrama de proteína total foram obtidos os extratos foliares de plantas de pepino, após a realização dos tratamentos por: pulverização de água, aos 7 e 14 dias antes da extração (controle 7 dias e controle 14 dias); tratamento apenas com *Trichoderma* sp. IB 31/06, aos sete dias (IB 31/06 7 dias) e aos 14 dias (IB 31/06 14 dias), antes da extração; tratamento com *Trichoderma* sp., aos 7 dias antes da inoculação de *C. lagenarium* (IB 31/06 + *C. lagenarium*); e inoculação apenas do

patógeno (*C. lagenarium*), aos 7 dias antes da extração. As extrações – três por tratamento – foram realizadas em amostras de 1 g de folhas, conforme Irving & Kuć (1990). A quantificação de proteínas nos extratos vegetais foi realizada pelo método de Bradford (1976). A atividade da enzima peroxidase de cada extrato vegetal foi determinada a 30°C, em espectrofotômetro a 470 nm, pela medida da conversão do guaiacol em tetraguaiacol na presença de peróxido de hidrogênio (Lusso & Pascholati, 1999). Após três determinações para cada extrato foliar, foi realizado o cálculo da diferença entre a absorbância final e a inicial, e a atividade de peroxidase foi expressa como atividade específica em unidades de absorbância por minuto por miligrama de proteína.

Os 19 isolados de *Trichoderma* spp., previamente selecionados nos experimentos de promoção de crescimento e avaliados nos experimentos de indução de resistência, foram submetidos ao sequenciamento gênico para a identificação das espécies. A extração de DNA foi realizada de acordo com Murray & Thompson (1980) e, para a reação em cadeia da polimerase (PCR), foram utilizados os pares de iniciadores ITS 1 (5' TCCGTWGGTGAACCGC 3') e ITS 4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3'), que amplificam a região espaçadora entre os genes ribossomais 18S e 26S (White et al., 1990). Os fragmentos de DNA amplificados foram purificados e submetidos à reação de sequenciamento com o reagente Big Dye Terminator 3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), pelo método de terminação de cadeia (Sanger et al., 1977), e analisados em sequenciador automático ABI 377 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). As sequências de nucleotídeos foram submetidas aos programas TrichoBLAST e TrichoKEY, disponíveis em International Subcommission on *Trichoderma* and *Hypocrea* Taxonomy (2011), que permitem realizar a identificação molecular de fungos do gênero *Trichoderma*, por meio da comparação com sequências de espécies “vouchers” (Druzhinina et al., 2005; Kopchinskiy et al., 2005; Nagy et al., 2007).

Todos os experimentos foram repetidos três vezes. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e comparados pelo teste de Tukey, a 1% de probabilidade, com o Assistat, versão 7.5 Beta (Silva & Azevedo, 2006).

## Resultados e Discussão

No primeiro grupo de experimentos, realizados em janeiro e fevereiro de 2009, as linhagens que proporcio-

naram maior aumento na massa de matéria seca (MMS) e diferiram significativamente dos respectivos controles foram: IB 15/06, IB 22/08, IB 31/06, IB 32/06, IB 34/08, IB 38/11 e IB 47/05, com valores entre 47,83 e 86,90% (Tabelas 1 e 2). Na segunda repetição dos experimentos, realizada em julho e agosto de 2009, o maior aumento na MMS foi obtido com os isolados: IB 01/03, IB 01/13, IB 04/08, IB 07/09, IB 17/07, IB 28/07, IB 31/06, IB 34/08 e IB 42/03, com valores entre 52,88 e 100%. Na terceira repetição dos experimentos, realizada em novembro e dezembro de 2009, os isolados que mais aumentaram a MMS das plantas, tendo diferido dos respectivos controles, foram: IB 01/03, IB 15/06, IB 18/13, IB 34/01, IB 37/01, IB 46/11 e IB 48/23, com incrementos entre 43,37 e 89,83%. Além disso, o produto Trichodermil, formulado com a linhagem IT 13/06, promoveu aumento de 74,58% na MMS da parte aérea das plantas de pepino. Com a realização dos experimentos, foram observados diferentes incrementos na MMS das plantas de pepino, em cada grupo de experimentos, e as plantas tratadas com os isolados IB 01/03, IB 15/06, IB 31/06 e IB 34/08 apresentaram aumentos significativos da MMS em dois dos três grupos de experimentos realizados. A variabilidade do efeito dos isolados no crescimento das plantas pode estar relacionada à realização dos experimentos em diferentes períodos do ano. Segundo Akrami et al. (2011), vários fatores podem interferir na eficiência dos agentes benéficos, entre eles os abióticos, principalmente a temperatura e a umidade, que são consideradas cruciais para garantir o bom desempenho dos isolados de *Trichoderma* spp.

Segundo Brotman et al. (2010), espécies de *Trichoderma* spp. podem promover aumentos de até 300% no crescimento de plantas. Os resultados do presente trabalho corroboram os de Yedidia et al. (2001), que avaliaram o efeito de *T. harzianum* sobre o crescimento de pepineiro e observaram aumento significativo de 80% na MMS da parte aérea das plantas. No experimento de indução de resistência em pepineiro, todos os isolados de *Trichoderma*, introduzidos no substrato de crescimento sete dias antes da inoculação de *C. lagenarium* nas folhas das plantas, reduziram significativamente os sintomas da doença e conferiram proteção sistêmica contra a antracnose de 56,36 a 88,39% (Tabela 3). Os isolados que mais se destacaram foram: IB 01/03, IB 01/13, IB 07/09, IB 31/06, IB 34/08 e IB 37/01, que conferiram proteção acima de 83%. Além disso, plantas tratadas com o produto Trichodermil (IT 13/06) também apresentaram redução



significativa dos sintomas de antracnose, em comparação ao controle não tratado.

Os isolados de *Trichoderma* spp. colonizam a epiderme e as células do córtex das raízes e, conseqüentemente, ativam vias de sinalização, desencadeando respostas de defesa nas plantas (Brotman et al., 2010). Em experimento realizado em pepineiro, tratado com *T. asperellum*, os sintomas da doença causada por *P. syringae* pv. *lachrymans* foram reduzidos em 80%, em comparação às folhas não tratadas. De acordo com os autores, a separação espacial entre o tratamento com *Trichoderma* no solo e a inoculação do patógeno nas folhas, que resultou na redução

da mancha-angular nas folhas, evidenciou a ocorrência de indução de resistência sistêmica nesse patossistema (Yedidia et al., 2003). Segundo Segarra et al. (2009), em estudos realizados em *Arabidopsis thaliana*, com o isolado T-34 de *T. asperellum* para induzir resistência contra *P. syringae* pv. *tomato*, foi observado que as plantas tratadas apresentaram menos sintomas de doença do que as plantas controle.

Os conídios de *Trichoderma* spp., presentes nos grãos de arroz, foram quantificados no início dos experimentos de indução de resistência. Observou-se que, entre os 19 isolados avaliados, a quantidade

**Tabela 1.** Massa de matéria seca de plantas de pepino, tratadas com 30 isolados de *Trichoderma* spp., avaliada nos experimentos realizados em janeiro, julho e novembro de 2009<sup>(1)</sup>.

Tratamento	Janeiro		Julho		Novembro	
	Massa de matéria seca (g)	Crescimento <sup>(2)</sup> (%)	Massa de matéria seca (g)	Crescimento <sup>(2)</sup> (%)	Massa de matéria seca (g)	Crescimento <sup>(2)</sup> (%)
Controle	0,092±0,004ef	-	0,076±0,007d	-	0,083±0,003cd	-
IB 01/05	0,116±0,013abcdef	26,08	0,093±0,006bcd	22,36	0,092±0,003bcd	10,85
IB 01/13	0,130±0,007abcde	41,30	0,123±0,006ab	61,84	0,085±0,003bcd	2,40
IB 04/05	0,104±0,004cdef	13,05	0,108±0,009bcd	42,11	0,083±0,007cd	0,00
IB 04/08	0,115±0,003abcdef	25,00	0,117±0,003abc	53,94	0,077±0,001d	-7,22
IB 04/09	0,094±0,010def	2,17	0,109±0,013bcd	43,42	0,082±0,004cd	-1,20
IB 08/04	0,130±0,005abcde	41,30	0,105±0,007bcd	38,16	0,098±0,006abcd	18,08
IB 09/02	0,116±0,007abcdef	26,08	0,114±0,005abcd	50,00	0,093±0,008bcd	12,05
IB 10/05	0,125±0,011abcdef	35,87	0,104±0,006bcd	36,84	0,090±0,007bcd	8,43
IB 11/09	0,111±0,007abcdf	20,66	0,076±0,004d	0,00	0,090±0,002bcd	8,43
IB 11/12	0,114±0,004abcdef	23,91	0,105±0,006bcd	38,16	0,084±0,005cd	1,20
IB 13/08	0,099±0,006cdef	7,61	0,100±0,003bcd	31,57	0,092±0,011bcd	10,85
IB 14/04	0,099±0,003cdef	7,61	0,094±0,003bcd	23,68	0,085±0,005bcd	2,40
IB 15/06	0,138±0,006abc	50,00	0,090±0,009bcd	18,42	0,119±0,009ab	43,37
IB 17/07	0,116±0,011abcdef	26,08	0,120±0,007abc	57,89	0,085±0,003bcd	2,40
IB 18/03	0,113±0,008abcdef	22,83	0,075±0,003d	-1,32	0,085±0,004cd	2,40
IB 18/22	0,104±0,008cdef	13,05	0,114±0,009abcd	50,00	0,095±0,002bcd	14,45
IB 20/02	0,095±0,003cdef	3,27	0,105±0,005bcd	38,16	0,081±0,003d	-2,40
IB 22/08	0,149±0,010ab	61,96	0,106±0,008bcd	39,48	0,090±0,004bcd	8,43
IB 26/06	0,086±0,002f	-6,52	0,094±0,007bcd	23,68	0,097±0,003abcd	16,87
IB 26/07	0,106±0,004bcdef	15,22	0,081±0,006cd	6,57	0,099±0,007abcd	19,27
IB 31/06	0,152±0,008a	65,22	0,152±0,008a	100,00	0,086±0,009bcd	3,61
IB 37/01	0,099±0,006cdef	7,61	0,097±0,008bcd	27,64	0,131±0,014a	57,83
IB 37/05	0,097±0,008cdef	5,44	0,110±0,011bcd	44,73	0,101±0,006abcd	21,68
IB 38/11	0,136±0,015abcd	47,83	0,088±0,005bcd	15,79	0,080±0,004d	-3,61
IB 42/15	0,113±0,005abcdef	22,83	0,113±0,006abcd	48,68	0,115±0,004abc	38,55
IB 46/10	0,104±0,005cdef	13,05	0,112±0,008bcd	47,36	0,087±0,005bcd	4,82
IB 47/05	0,150±0,009a	63,04	0,106±0,007bcd	39,48	0,098±0,002abcd	18,08
IB 50/01	0,129±0,011abcdef	40,22	0,089±0,005bcd	17,11	0,090±0,005bcd	8,43
IB 50/07	0,092±0,004ef	0,00	0,083±0,004bcd	9,21	0,097±0,009abcd	16,87
IB 50/20	0,120±0,005abcdef	30,44	0,091±0,003bcd	19,73	0,091±0,006bcd	9,63
CV(%)	15,30		15,95		15,07	

<sup>(1)</sup>Médias±erro-padrão seguidas de letras iguais, nas colunas, não diferem, entre si, pelo teste de Tukey, a 1% de probabilidade. Média de 25 repetições.

<sup>(2)</sup>Aumento de crescimento, determinado em relação ao controle, calculado como acréscimo na massa de matéria seca da parte aérea das plantas de pepino e expresso como percentagem.

de conídios por grama de arroz colonizado variou de  $1,4 \times 10^9$  (IB 07/09 e IB 15/06) a  $5,3 \times 10^9$  (IB 34/08), enquanto o número médio de conídios por mililitro do produto comercial foi de  $3,5 \times 10^9$  (IT 13/06). A percentagem de conídios germinados variou entre 46,9% (IB 37/01) e 89,9% (IB 31/06), o que confirma a viabilidade dos conídios presentes no arroz colonizado.

Não foi observada correlação direta entre a viabilidade dos isolados e a capacidade de controlar a antracnose.

Constatou-se que o isolado IB 31/06 conferiu proteção significativa contra a antracnose, em todos os intervalos de tempo avaliados (Tabela 4). É importante ressaltar que a aplicação do isolado, apenas três dias antes da inoculação do patógeno nas plantas, reduziu

**Tabela 2.** Massa de matéria seca de plantas de pepino, tratadas com 30 isolados de *Trichoderma* spp., avaliada nos experimentos realizados em fevereiro, agosto e dezembro de 2009<sup>(1)</sup>.

Tratamento	Fevereiro		Agosto		Dezembro	
	Massa de matéria seca (g)	Crescimento <sup>(2)</sup> (%)	Massa de matéria seca (g)	Crescimento <sup>(2)</sup> (%)	Massa de matéria seca (g)	Crescimento <sup>(2)</sup> (%)
Controle	0,084±0,01c	-	0,104±0,006fgh	-	0,059±0,004e	-
IB 01/03	0,090±0,005c	7,14	0,194±0,003a	86,54	0,095±0,005abcd	61,01
IB 02/03	0,107±0,002bc	27,38	0,110±0,007defgh	5,76	0,093±0,003abcde	57,62
IB 04/04	0,094±0,003c	11,91	0,107±0,13defgh	2,88	0,080±0,004abcde	35,59
IB 06/04	0,100±0,003c	19,04	0,146±0,005abcdef	40,38	0,090±0,008abcde	52,55
IB 07/09	0,090±0,004c	7,14	0,160±0,005abcd	53,85	0,092±0,005abcde	55,93
IB 18/13	0,094±0,005c	11,91	0,145±0,008abcdef	39,43	0,107±0,004ab	81,35
IB 19/17	0,085±0,003c	1,20	0,112±0,007defgh	7,69	0,074±0,004bcde	25,42
IB 19/19	0,095±0,004c	13,09	0,105±0,017efgh	0,96	0,060±0,002de	1,69
IB 22/03	0,101±0,004c	20,24	0,150±0,009abcdef	44,24	0,083±0,005abcde	40,68
IB 26/10	0,099±0,004c	17,85	0,157±0,007abcdef	50,96	0,079±0,007abcde	33,89
IB 26/11	0,092±0,004c	9,53	0,074±0,008h	-28,84	0,087±0,007abcde	47,45
IB 26/12	0,090±0,004c	7,14	0,081±0,003gh	-22,12	0,074±0,005bcde	25,42
IB 27/10	0,097±0,003c	15,48	0,119±0,009defgh	14,43	0,081±0,006abcde	37,28
IB 28/06	0,102±0,003bc	21,43	0,144±0,011abcdef	38,46	0,081±0,011abcde	37,28
IB 28/07	0,099±0,008c	17,85	0,159±0,011abcde	52,88	0,083±0,004abcde	40,68
IB 28/14	0,112±0,014bc	33,33	0,103±0,003fgh	-0,96	0,079±0,002abcde	33,89
IB 32/06	0,135±0,005ab	60,71	0,139±0,005abcdef	33,65	0,074±0,007bcde	25,42
IB 34/01	0,092±0,003c	9,53	0,128±0,006cdefgh	23,07	0,095±0,006abcd	61,01
IB 34/08	0,157±0,006a	86,90	0,176±0,009abc	69,23	0,068±0,003cde	15,25
IB 34/10	0,117±0,011bc	39,28	0,156±0,007abcdef	50,00	0,094±0,010abcde	59,32
IB 40/12	0,101±0,006c	20,24	0,112±0,007defgh	7,69	0,086±0,003abcde	45,76
IB 42/03	0,110±0,002bc	30,96	0,183±0,016ab	75,96	0,087±0,006abcde	47,45
IB 46/08	0,100±0,008c	19,04	0,133±0,007bcdefg	27,88	0,063±0,005de	6,78
IB 46/11	0,100±0c	19,04	0,141±0,010abcdef	35,57	0,102±0,006abc	72,88
IB 47/16	0,102±0,005c	21,43	0,126±0,005cdefgh	21,15	0,077±0,005abcde	30,51
IB 48/06	0,091±0,003c	8,33	0,120±0,013defgh	15,38	0,081±0,008abcde	37,28
IB 48/09	0,100±0,006c	19,04	0,151±0,009abcdef	45,19	0,068±0,003cde	15,25
IB 48/23	0,093±0,004c	10,72	0,119±0,008defgh	14,43	0,112±0,017 <sup>a</sup>	89,83
IB 49/08	0,104±0,002bc	23,80	0,113±0,006defgh	8,65	0,085±0,004abcde	44,07
IB 49/16	0,087±0,005c	3,57	0,106±0,004defgh	1,93	0,083±0,004abcde	40,68
Trichodermil	-	-	-	-	0,103±0,004abc	74,58
CV (%)	13,29		17,20		17,36	

<sup>(1)</sup>Médias±erro-padrão seguidas de letras iguais não diferem, pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade. Média de 25 repetições. <sup>(2)</sup>Aumento de crescimento, determinado em relação ao controle, calculado como acréscimo na massa de matéria seca da parte aérea das plantas de pepino e expresso como percentagem.

significativamente os sintomas da antracnose. Isso indica que o tratamento prévio com *Trichoderma* pode controlar em poucos dias a doença, embora se tenha observado um aumento considerável na proteção da planta do terceiro para o sétimo dia.

Koike et al. (2001) também observaram um rápido efeito de *Trichoderma* em pepineiro, que induziu lignificação, produção de superóxido e proteção contra *Colletotrichum orbiculare* e *P. syringae* pv. *lachrymans* de 59 e 52%, respectivamente, quando aplicado nas raízes um dia antes da inoculação dos patógenos nas folhas. Yedidia et al. (2003) também constataram diminuição de 50% do diâmetro das lesões causadas por *P. syringae* pv. *lachrymans* em pepineiro, em decorrência do tratamento das raízes com *T. asperellum* dois dias antes da inoculação do patógeno. De acordo com Perazzoli et al. (2008), o tratamento de videira com *T. harzianum*, realizado um dia antes da inoculação de *Plasmopara viticola* para o controle do míldio, reduziu as lesões da doença em 38%. Entretanto, quando *T. harzianum* foi aplicado aos 7 ou 14 dias antes da

inoculação do patógeno, as reduções foram de apenas 12 e 4%, respectivamente, e diferiram dos resultados observados no presente trabalho.

Não houve diferença significativa, quanto à ativação da enzima peroxidase, entre os tratamentos realizados com o isolado IB 31/06 após 7 ou 14 dias, em comparação ao tratamento controle (Figura 1). Apenas as plantas infectadas com *C. lagenarium*, previamente tratadas ou não com IB 31/06, apresentaram aumento significativo da atividade enzimática. No entanto, Yedidia et al. (1999) verificaram que o agente de biocontrole *T. harzianum* induz o aumento da atividade dessa enzima em plantas de pepino. De acordo com esses autores, a atividade de peroxidase aumentou após intervalos de tempo inferiores a sete dias, o que pode explicar o resultado obtido no presente trabalho, em que não foi observado aumento da atividade enzimática aos 7 e 14 dias após o tratamento das plantas com IB 31/06.

Dos 19 isolados de *Trichoderma* spp. que se destacaram como agentes promotores de crescimento e protegeram o pepineiro contra a antracnose, 11 foram identificados como *T. harzianum* (Tabela 5). Além dessa, foram identificadas, ainda, as espécies: *T. asperellum* (três isolados), *T. atroviride* (dois isolados), *T. strigosum* (um isolado), *T. longibrachiatum* (um isolado), *T. koningiopsis* ou *T. ovalisporum* (um isolado). Os isolados apresentaram similaridade

**Tabela 3.** Severidade de antracnose em pepineiro, em substrato infestado com isolados de *Trichoderma* spp. aos sete dias antes da inoculação de *Colletotrichum lagenarium*<sup>(1)</sup>.

Tratamento	Número médio de lesões por planta	Redução da severidade (%) <sup>(2)</sup>
Controle	49,95±3,66a	-
IB 18/13	21,80±3,65b	56,36
IB 47/05	21,75±3,74b	56,46
IB 28/07	18,45±3,66bc	63,07
IB 42/03	16,15±3,20bc	67,67
IB 34/01	14,89±1,72bc	70,20
IB 04/08	14,40±4,58bc	71,18
IB 17/07	14,35±1,86bc	71,28
IB 48/23	12,50±4,28bc	74,98
IB 15/06	12,15±1,26bc	75,68
IB 46/11	11,50±1,91bc	76,98
IB 32/06	06,60±2,21bc	80,79
IB 22/08	09,05±1,79bc	81,89
IB 38/11	08,90±0,93bc	82,19
Trichodermil	08,77±1,29bc	82,44
IB 37/01	08,05±0,74c	83,88
IB 01/13	07,35±2,22c	85,29
IB 07/09	07,06±1,07c	86,41
IB 34/08	07,00±1,60c	85,99
IB 01/03	06,35±1,06c	87,30
IB 31/06	05,80±1,21c	88,39
CV(%)	60,24	

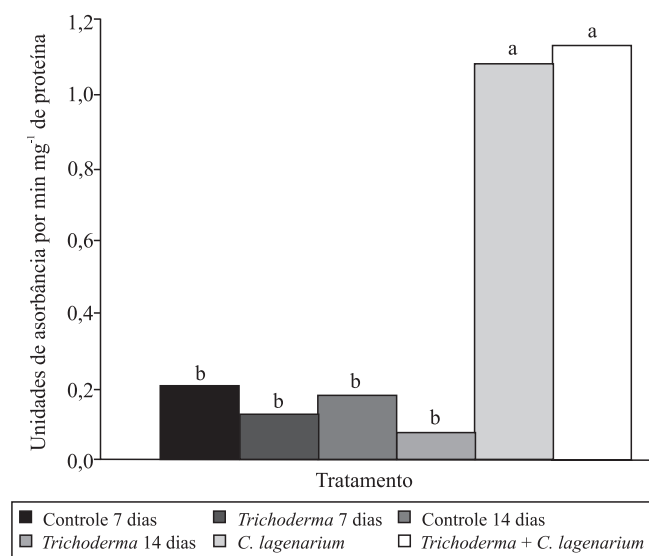
<sup>(1)</sup>Médias±erro-padrão seguidas de letras iguais, nas colunas, não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade. Média de dez repetições.

<sup>(2)</sup>Determinada em relação ao controle.

**Tabela 4.** Severidade da antracnose em pepineiro, em substrato infestado com o isolado de *Trichoderma* spp. (IB 31/06) aos 3, 7 ou 14 dias antes da inoculação de *Colletotrichum lagenarium*<sup>(1)</sup>.

Tratamento	Número médio de lesões por planta	Redução da severidade (%) <sup>(2)</sup>
3 dias		
IB 31/06	09,75±1,33b	49,22
Controle	19,20±2,56a	-
CV (%)		44,60
7 dias		
IB 31/06	04,20±0,48b	69,45
Controle	13,75±1,34a	-
CV (%)		35,84
14 dias		
IB 31/06	04,20±1,26b	78,68
Controle	19,70±2,13a	-
CV (%)		46,56

<sup>(1)</sup>Médias±erro-padrão seguidas de letras iguais, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 1% de probabilidade. Média de dez repetições. <sup>(2)</sup>Redução da severidade determinada em relação ao controle.



**Figura 1.** Atividade da peroxidase dos extratos foliares de pepineiro tratados com: água, controle; isolado de *Trichoderma* spp. IB 31/06, durante 7 e 14 dias; IB 31/06, 7 dias antes da inoculação de *Colletotrichum lagenarium*; e *C. lagenarium*. Tratamentos seguidos por letras iguais não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 1% de probabilidade.

**Tabela 5.** Espécies de *Trichoderma* spp., identificadas por sequenciamento gênico da região ITS do DNA ribossômico e pelas sequências de nucleotídeos, nos programas TrichoBLAST e TrichOKEY, por meio da comparação com sequências de espécies “vouchers”.

Isolado	Espécie	Autores das espécies
IB 01/03	<i>Trichoderma asperellum</i>	Samuels, Lieckfeldt & Nirenberg, 1999
IB 01/13	<i>Trichoderma asperellum</i>	Samuels, Lieckfeldt & Nirenberg, 1999
IB 04/08	<i>Trichoderma asperellum</i>	Samuels, Lieckfeldt & Nirenberg, 1999
IB 07/09	<i>Trichoderma atroviride</i>	Karsten, 1892
IB 15/06	<i>Trichoderma harzianum</i>	Rifai, 1969, 1991
IB 17/07	<i>Trichoderma harzianum</i>	Rifai, 1969, 1991
IB 18/13	<i>Trichoderma atroviride</i>	Karsten, 1892
IB 22/08	<i>Trichoderma harzianum</i>	Rifai, 1969, 1991
IB 28/07	<i>Trichoderma strigosum</i>	Bissett, 1991
IB 31/06	<i>Trichoderma harzianum</i>	Rifai, 1969, 1991
IB 32/06	<i>Trichoderma harzianum</i>	Rifai, 1969, 1991
IB 34/01	<i>Trichoderma harzianum</i>	Rifai, 1969, 1991
IB 34/08	<i>Trichoderma harzianum</i>	Rifai, 1969, 1991
IB 37/01	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	Bissett, 1984
IB 38/11	<i>Trichoderma harzianum</i>	Rifai, 1969, 1991
IB 42/03	<i>Trichoderma harzianum</i>	Rifai, 1969, 1991
IB 46/11	<i>Trichoderma harzianum</i>	Rifai, 1969, 1991
IB 47/05	<i>Trichoderma harzianum</i>	Rifai, 1969, 1991
IB 48/23	<i>Trichoderma koningiopsis</i> ou <i>T. ovalisporum</i>	Samuels, Suarez & Evans, 2006; Samuels & Schroers, 2004

superior a 98%, em comparação aos isolados “voucher” das bases de dados, para a região ITS, identificados pelo programa TrichOKEY. O isolado IB 48/23 foi identificado como *T. ovalisporum* ou *T. koningiopsis*. De acordo com Druzhinina et al. (2005), essas espécies não são distinguíveis pelo sequenciamento da região ITS, pois possuem sequências idênticas. Entre os isolados caracterizados como *T. harzianum* (IB 15/06, IB 17/07, IB 22/08, IB 31/06, IB 32/06, IB 34/01, IB 34/08, IB 38/11, IB 42/03, IB 46/11 e IB 47/05), o IB 31/06 se destacou na promoção de crescimento de plantas e na redução das lesões de antracnose em pepineiro. Além deste, os demais dez isolados, caracterizados como *T. harzianum*, também foram eficientes na proteção contra a antracnose, tendo reduzido a severidade da doença de 56,46 a 85,99% (IB 47/05 e IB 34/08). No presente trabalho, as espécies *T. asperellum* (IB 01/03, IB 01/13 e IB 04/08) e *T. atroviride* (IB 07/09 e IB 18/13) foram também identificadas (Tabela 5). Estes isolados também se destacaram como indutores de resistência contra *C. lagenarium* e conferiram proteção a pepineiro de 56,36 a 87,30% (Tabelas 3).

## Conclusões

1. Dezenove isolados de *Trichoderma* spp. e o produto Trichodermil promovem o crescimento em plantas de pepino e induzem resistência à antracnose em pepineiro.

2. As espécies *Trichoderma harzianum*, *T. asperellum*, *T. atroviride*, *T. strigosum*, *T. longibrachiatum*, e *T. koningiopsis* ou *T. ovalisporum* são eficientes como promotores do crescimento de plantas e como indutores de resistência à antracnose em pepineiro.

## Agradecimentos

À Empresa Itaforte Bioprodutos, pelo auxílio financeiro concedido e pelo fornecimento do produto comercial utilizado neste trabalho.

## Referências

- AGRIOS, G.N. **Plant pathology**. 5<sup>th</sup> ed. San Diego: Academic, 2004. 952p.
- AKRAMI, M.; GOLZARY, H.; AHMADZADEH, M. Evaluation of different combinations of *Trichoderma* species for controlling *Fusarium* rot of lentil. **African Journal of Biotechnology**, v.10, p.2653-2658, 2011.



- BJÖRKMANN, T.; BLANCHARD, L.M.; HARMAN, G.E. Growth enhancement of *shrunk-2* (*sh2*) sweet corn by *Trichoderma harzianum* 1295-22: effect of environmental stress. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.123, p.35-40, 1998.
- BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.
- BROTMAN, Y.; GUPTA, K.J.; VITERBO, A. *Trichoderma*. **Current Biology**, v.20, p.R390-R391, 2010.
- DRUZHININA, I.S.; KOPTCHINSKI, A.G.; KOMOM, M.; BISSET, J.; SZAKACS, G.; KUBICEK, C.P. An oligonucleotide barcode for species identification in *Trichoderma* and *Hypocrea*. **Fungal Genetics and Biology**, v.42, p.813-828, 2005.
- HARMAN, G.E.; HOWELL, C.R.; VITERBO, A.; CHET, I.; LORITO, M. *Trichoderma* species - opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature Reviews Microbiology**, v.2, p.43-56, 2004.
- INTERNATIONAL Subcommittee on *Trichoderma* and *Hypocrea* Taxonomy. Available at: <http://www.isth.info/>. Accessed on. 26 Dec. 2011.
- IRVING, H.R.; KUĆ, J. Local and systemic induction of peroxidase, chitinase and resistance in cucumber plants by  $K_2HPO_4$ . **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.37, p.355, 1990.
- KOIKE, N.; HYAKUMACHI, M.; KAGEYAMA, K.; TSUYUMU, S.; DOKE, N. Induction of systemic resistance in cucumber against several diseases by plant growth-promoting fungus: lignification and superoxide generation. **European Journal of Plant Pathology**, v.107, p.523-533, 2001.
- KOPCHINSKIY, A.; KOMON, M.; KUBICEK, C.P.; DRUZHININA, I.S. TrichoBLAST: a multilocus database for *Trichoderma* and *Hypocrea* identifications. **Mycological Research**, v.109, p.658-660, 2005.
- KUĆ, J.; RICHMOND, S. Aspects of the protection of cucumber against *Colletotrichum lagenarium* by *Colletotrichum lagenarium*. **Phytopathology**, v.67, p.533-536, 1977.
- LUSSO, M.F.G.; PASCHOLATI, S.F. Activity and isoenzymatic pattern of soluble peroxidases in maize tissues after mechanical injury or fungal inoculation. **Summa Phytopathologica**, v.25, p.244-249, 1999.
- MURRAY, M.G.; THOMPSON, W.F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. **Nucleic Acids Research**, v.8, p.4321-4325, 1980.
- NAGY, V.; SEIDL, V.; SZAKACS, G.; KOMON-ZELAZOWSKA, M.; KUBICEK, C.P.; DRUZHININA, I.S. Application of DNA bar codes for screening of industrially important fungi: the haplotype of *Trichoderma harzianum* sensu stricto indicates superior chitinase formation. **Applied and Environmental Microbiology**, v.73, p.7048-7058, 2007.
- PERAZZOLLI, M.; DAGOSTIN, S.; FERRARI, A.; ELAD, Y.; PERTOT, I. Induction of systemic resistance against *Plasmopara viticola* in grapevine by *Trichoderma harzianum* T39 and benzothiadiazole. **Biological Control**, v.47, p.228-234, 2008.
- RIOS, P.R.P.; SILVEIRA, E.B.; MARTINS, L.S.S.; SILVA NETO, E.B.; GOMES, A.M.A. Caracterização de isolados de *Colletotrichum lagenarium* de pepino com base em marcadores isoenzimáticos. **Horticultura Brasileira**, v.22, p.729-733, 2004.
- SANGER, F.; NICKLEN, S.; CHASE, A.R. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.74, p.5463-5468, 1977.
- SEGARRA, G.; VAN DER ENT, S.; TRILLAS, I.; PIETERSE, C.M.J. MYB72, a node of convergence in induced systemic resistance triggered by a fungal and a bacterial beneficial microbe. **Plant Biology**, v.11, p.90-96, 2009.
- SHORESH, M.; YEDIDIA, I.; CHET, I. Involvement of jasmonic acid/ethylene signaling pathway in the systemic resistance induced in cucumber by *Trichoderma asperellum* T203. **Phytopathology**, v.95, p.76-84, 2005.
- SILVA, F. de A.S. e.; AZEVEDO, C.A.V. de. A new version of the Assistant-Statistical Assistance Software. In: WORLD CONGRESS ON COMPUTERS IN AGRICULTURE, 4., 2006, Orlando. **Proceedings**. Orlando: American Society of Agricultural and Biological Engineers, 2006. p.393-396.
- VINALE, F.; SIVASITHAMPARAM, K.; GHISALBERT, E.L.; MARA, R.; BARBETTI, M.J.; LI, H.; WOO, S.L.; LORITO, M. A novel role for *Trichoderma* secondary metabolites in the interactions with plants. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.72, p.80-86, 2008.
- VITERBO, A.; HAREL, M.; HORWITZ, B.A.; CHET, I.; MUKHERJEE, P.K. *Trichoderma* mitogen-activated protein kinase signaling is involved in induction of plant systemic resistance. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, p.6241-6246, 2005.
- WHITE, T.J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M.A.; GELFAND, D.H.; SHINSKY, J.J.; WHITE, T.J. (Ed.). **PCR protocols: a guide to methods and applications**. San Diego: Academic, 1990. p.315-322.
- YEDIDIA, I.; BENHAMOU, N.; CHET, I. Induction of defense responses in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, p.1061-1070, 1999.
- YEDIDIA, I.; BENHAMOU, N.; KAPULNIK, Y.; CHET, I. Induction and accumulation of PR proteins activity during early stages of root colonization by the mycoparasite *Trichoderma harzianum* strain T-203. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.38, p.863-873, 2000.
- YEDIDIA, I.; SHORESH, M.; KEREM, Z.; BENHAMOU, N.; KAPULNIK, Y.; CHET, I. Concomitant induction of systemic resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* in cucumber by *Trichoderma asperellum* (T-203) and accumulation of phytoalexins. **Applied and Environmental Microbiology**, v.69, p.7343-7353, 2003.
- YEDIDIA, I.; SRIVASTVA, A.K.; KAPULNIK, Y.; CHET, I. Effect of *Trichoderma harzianum* on microelement concentrations and increased growth of cucumber plants. **Plant and Soil**, v.235, p.235-242, 2001.